

総説 (第22回徳島医学会賞受賞論文)

microRNA で化学放射線療法の効果を予測する

西岡 将規, 島田 光生, 宇都宮 徹, 栗田 信浩, 岩田 貴,
森本 慎也, 吉川 幸造, 東島 潤

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部器官病態修復医学講座消化器・移植外科学分野

(平成21年7月2日受付)

(平成21年7月15日受理)

1. はじめに

下部直腸・肛門管癌の治療においては根治性と機能温存をバランスよく保つことが最も重要である。手術手技、デバイスの進歩により自然肛門温存率は向上してきたが、局所再発抑制に関しては欧米で標準治療として確立されている術前化学放射線療法が本邦でも最近注目されている。下部直腸癌に対する術前化学放射線療法は局所再発を抑制し、肛門温存率を向上させるなどのメリットがある反面、排便・排尿・性機能を障害するといったデメリットもある。それゆえに術前化学放射線療法の効果予測は大きな課題である。本稿では、下部直腸・肛門管癌に対する術前化学放射線療法とその効果予測について、筆者らが明らかにした microRNA での効果予測の研究成果をふまえ概説する。

2. microRNA

2.1. microRNA とは

DNA の遺伝情報は、メッセンジャー RNA に転写され、その情報に基づいて蛋白質が合成される。従来、細胞内の RNA は、DNA 遺伝情報伝達過程における仲介役にすぎないと考えられていた。しかし、近年の分子探索研究の進歩により、細胞内には蛋白質の合成には直接かわらないが、直接機能を持つ non-coding RNA と総称される多くの RNA が存在することが発見された。microRNA (miRNA) は、この non-coding RNA の 1 種で、約22塩基長のごく小さな一本鎖 RNA であるが、こ

こ数年の研究により、細胞の増殖、分化、アポトーシスなどの重要な役割を果たしていることが急速に明らかとなりつつある。しかし miRNA の生合成を調節するシグナルや反応過程などのメカニズムはほとんど不明である。

2.2. 癌と microRNA

そもそも、ヒトのゲノム上に miRNA が存在することが明らかとなったのは2000年のことであり、癌の発生、進展と miRNA の発現異常との関連に関する初めての知見として、慢性リンパ性白血病における miRNA の発現異常が報告されたのは2002年である¹⁾。最近、miRNA の発現変化が癌の発生や進展、分化に関与することが相次いで報告され、小さな機能性 RNA が癌抑制遺伝子や癌遺伝子などの制御において重要な役割を担っていることが示唆されている。大腸癌でも miRNA 発現プロファイルと予後および化学療法の効果との関連に関する報告がなされている²⁾。それぞれの miRNA は100以上と推定されている多くの遺伝子を直接制御することから、その働きは広い範囲に及ぶ。そのために、癌治療に応用した場合は高い効果が期待されている。

3. 化学放射線療法

3.1. 直腸癌に対する化学放射線療法

直腸癌の再発形式で最も頻度が高いのは局所再発であり、局所再発抑制のために側方郭清や化学放射線療法が行われている。欧米では進行直腸癌に対して術前化学放射線療法および TME (total mesorectum excision) が標

準治療であり、多くのエビデンスが積み上げられてきた。その中でドイツからの報告³⁾では、5年生存率は術前施行群76%、術後施行群74%で差はなかったが、局所再発率は術前施行群5%、術後施行群13%であり術前施行群で有意に低率であった。治療前に肛門を切除する腹会陰式直腸切断術が必要とされた患者の39%では、術前の化学放射線療法によって括約筋温存手術が可能となっている。また、術後の下痢などの急性期毒性および吻合部狭窄などの晩期毒性はいずれも術前施行群で有意に低率であった。以上から現時点では、直腸癌への化学放射線治療は局所再発抑制、肛門温存を目的に術前に施行する方が望ましいと考えられている。

3.2. 化学放射線療法のデメリット

術前化学放射線療法を受けた患者では手術単独で治療された患者よりも術後の肛門管静止圧の低下が著しく⁴⁾、組織学的にも放射線照射は内肛門括約筋の線維化や壁在神経叢の障害を生じ⁵⁾、外肛門括約筋の神経支配である陰部神経の障害をきたすことが報告されている⁶⁾。

臨床的にも術前化学放射線療法を施行された患者では術後排便機能が不良となりやすく、術後長期経過しても改善しないと報告が多い⁷⁾。EORTC22921試験においても術前放射線単独療法と比較して術前化学放射線療法では有意にQOLと排便機能の悪化が認められている⁸⁾。今後、側方郭清と術前化学放射線療法に関する排便、排尿、性機能を含めたRCTによる検討が必要と思われる。

4. 化学放射線療法の効果予測

4.1. これまでの効果予測法

直腸癌に対して局所再発抑制、肛門温存を目的に術前化学放射線治療を行う場合、治療効果に個人差があること、少なからず化学放射線療法に副作用があることから、その効果予測は非常に重要な課題である。これまでSurvivin⁹⁾、Bax¹⁰⁾、MMP9¹¹⁾などの免疫組織染色による方法やDNA microarray¹²⁾による方法が報告されているが臨床応用には至っていない。われわれもDNA microarrayによる方法で、MMP7をはじめとする17遺伝子が効果予測に有用であることを報告した。ValidationとしてMMP7の免疫染色を行った結果、化学放射線療法に効果のあった群では40%の症例で陽性に染色されたのに対し、効果の少なかった群では全く染色されなかった。

さらなる効果予測の精度向上のため、近年、癌の発生や進展、分化に関与することが相次いで報告され、癌抑制遺伝子や癌遺伝子などの制御において重要な役割を担っていることが示唆されているmiRNAに注目し、miRNAによる化学放射線療法の効果予測を試みることにした。

4.2. microRNAによる効果予測

対象は術前化学放射線療法 (S-1 80mg/m²/day+Radiation 40Gy) を施行した直腸・肛門管癌22例。化学放射線療法前の腫瘍の生検組織で821geneのmicroRNAをHuman miRNA Microarray v2 (Agilent Technologies) を用いてmiRNA microarray解析を行った。Total RNAを脱リン酸化させサンプルを精製し、ハイブリダイゼーションの後にQuality controlを行い解析を行った。すべてのサンプルでTotal RNAの抽出は可能であった。検討項目は化学放射線療法の組織学的効果、RECIST判定およびDown stageの有無で、それぞれで比較検討し1.5倍以上の変化を示したmicroRNAをリスト化し統計学的に有意差のあるものを検出した。患者背景を表1、図1に示す。図1のCancer (ー)とは術前の化学放射線療法によりCR (Complete Response) が得られた症例で、切除標本での組織学的効果判定はGrade3を意味している。

術前化学放射線療法の組織学的効果はgrade1aが4例、grade1bが3例、grade2が13例、grade3が2例で奏効率(grade2, 3)は68%であった(図2)。Responder (grade2, 3)ではmiRNA 223 (fold change 3.13, p=0.026)、142が有意に高発現していた(表2)。

RECISTではPRが14例、SDが8例で奏効率は63%

表1：臨床病理学的所見

患者	22
M:F	17:5
年齢 (mean)	72 (41-82)
AV (cm)	3.0 (0-8.0)
腫瘍径 (cm)	3.0 (1.5-6.0)
病理	
分化癌	22
未分化癌	0
手術	
LAR	10
APR	9
Local excision	3

LAR: Low anterior resection

APR: Abdominoperineal resection

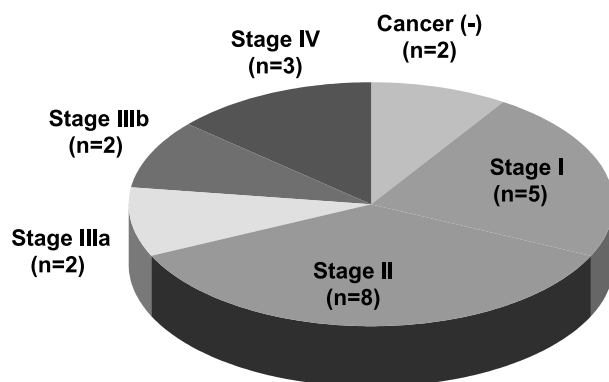


図 1：最終診断

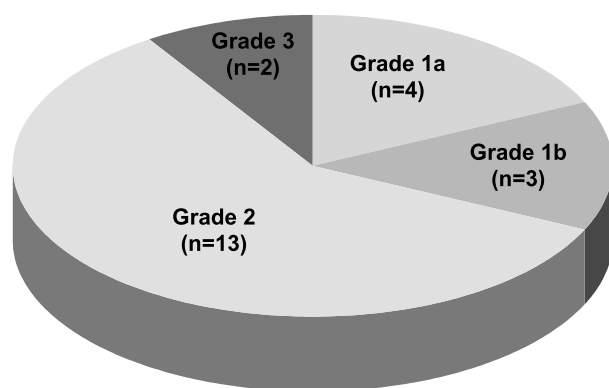


図 2：CRT の組織学的効果

表 2：効果予測遺伝子（組織学的効果）

MicroRNA	Fold change	Responder	Nonesponder	P(t test)
miR-223	3.13	2885.9	923.3	0.026
miR-142-3p	2.12	2081.0	980.1	0.026

であった。PR 症例では miRNA 223 (fold change 3.13, $p=0.034$) が有意に高発現し、miRNA 17, 20, 92, 106 が有意に低発現していた (表 3)。

Down stage の有無別では Down stage 有り 13 例、無し 9 例であった。Down stage の有り症例で miRNA 223 (fold change 3.36, $p=0.006$), 630, 126 が有意に高発現していた (表 4)。

化学放射線療法の組織学的効果、RECIST 判定および Down stage の有無でリスト化された miRNA によるクラスター解析では効果の有無別にクラスターが形成された (図 3)。

表 3：効果予測遺伝子 (RECIST)

MicroRNA	Fold change	RECIST		P(t test)
		PR(n=14)	SD(n=8)	
miR-223	3.13	2936.5	1032.8	0.034
miR-20b	0.61	370.1	603.5	0.048
miR-92a	0.61	640.8	1053.4	0.024
Let-7a*	0.59	2.0	3.4	0.048
miR-20a	0.58	1155.5	1988.4	0.041
miR-17*	0.55	50.0	90.6	0.012
miR-106a	0.55	69.6	126.2	0.024
miR-17	0.54	561.1	1039.6	0.024
miR-20a*	0.41	10.9	26.9	0.041

表 4：効果予測遺伝子 (Down stage)

MicroRNA	Fold change	Down stage		P(t test)
		PR(n=14) (+) (n=13)	SD(n=8) (-) (n=9)	
miR-223	3.36	3296.6	981.5	0.006
miR-630	2.79	191.0	68.4	0.042
miR-126*	1.87	50.5	32.3	0.049

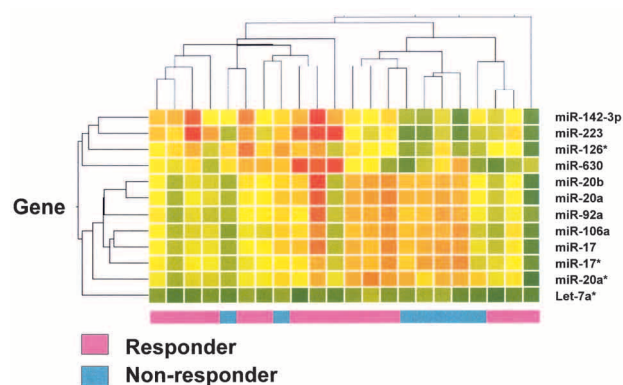


図 3：クラスター解析

5. おわりに

放射線治療は根治治療としても緩和療法としてもその意義が見直され、今後 4 人に 1 人は放射線治療を受けるようになると考えられている。放射線治療は大きな需要が見込まれており、個別化治療を目指した効果予測は重要な研究課題である。今回、術前の腫瘍生検組織の miRNA を評価することで、直腸癌に対する化学放射線療法の効果予測が可能となり個別化治療を行うことができる可能性を示した。今後はさらなる症例集積を行い、Validation を行うとともに PCR での検討を行う予定である。

文 献

- 1 . Calin, G. A., Dumitru, C. D., Shimizu, M., Bichi, R., *et al.* : Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR 16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **99**: 15524-15529, 2002
- 2 . Schetter, A. J., Leung, S. Y., Sohn, J. J., Zanetti, K. A., *et al.* : MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma. *JAMA*, **299** : 425-436, 2008
- 3 . Sauer, R., Becker, H., Hohenberger, W., Rödel, C., *et al.* : Preoperative postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *N. Engl. J. Med.*, **351** : 1731-1740, 2004
- 4 . Gervaz, P., Rotholtz, N., Pisano, M., Kaplan, E., *et al.* : Quantitative short-term study of anal sphincter function after chemoradiation for rectal cancer. *Arch. Surg.*, **136** : 192-196, 2001
- 5 . Da Silva, G. M., Berho, M., Wexner, S. D., Efron, J., *et al.* : Histologic analysis of the irradiated anal sphincter. *Dis. Colon. Rectum.*, **46** : 1492-1497, 2003
- 6 . Lim, J. F., Tjandra, J. J., Hiscock, R., Chao, M. W., *et al.* : Preoperative chemoradiation for rectal cancer causes prolonged pudendal nerve terminal motor latency. *Dis. Colon. Rectum.*, **49** : 12-19, 2006
- 7 . Pollack, J., Holm, T., Cedermark, B., Holmström, B., *et al.* : Long-term effect of preoperative radiation therapy on anorectal function. *Dis. Colon Rectum*, **49** : 345-352, 2006
- 8 . Merceier, M., Pasquet, P., Puyraveau, M., Bosset, F. J., *et al.* : Evaluation of the sphincter function and quality of life in French patients with rectal cancer who entered the EORTC 22921 study. *Eur. J. Cancer*, **2** (Supple 3) : 171, 2005
- 9 . Rodel, F., Hoffmann, J., Distel, L., Herrmann, M., *et al.* : Survivin as a Radioresistance Factor, and Prognostic and Therapeutic Target for Radiotherapy in Rectal Cancer. *Cancer Res.*, **65** : 4881-4887, 2005
- 10 . Chang, H. J., Jung, K. H., Kim, D. Y., Jeong, S. Y., *et al.* : Bax, a predictive marker for therapeutic response to preoperative chemoradiotherapy in patients with rectal carcinoma. *Human Pathology*, **36** : 364-371, 2005
- 11 . Unsal, D., Uner, A., Akyurek, N., Erpolat, P., *et al.* : MATRIX METALLOPROTEINASE-9 EXPRESSION CORRELATED WITH TUMOR RESPONSE IN PATIENTS WITH LOCALLY ADVANCED RECTAL CANCER UNDERGOING PREOPERATIVE CHEMORADIOOTHERAPY. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.*, **67** : 196-203, 2007
- 12 . Watanabe, T., Komuro, Y., Kiyomatsu, T., Kanazawa, T., *et al.* : Prediction of Sensitivity of Rectal Cancer Cells in Response to Preoperative Radiotherapy by DNA Microarray Analysis of Gene Expression Profiles. *Cancer Res.*, **66** : 3370-3374, 2006

MicroRNA expression predicts pathological response to chemoradiotherapy in rectal cancer

Masanori Nishioka, Mitsuo Shimada, Toru Utsunomiya, Nobuhiro Kurita, Takashi Iwata, Shinya Morimoto, Kozo Yoshikawa, and Jun Higashijima

Department of Digestive and Pediatric Surgery, Institute of Health Biosciences, the University of Tokushima Graduate School, Tokushima, Japan

SUMMARY

While global microRNA (miRNA) expression patterns of many embryologic, physiologic, and oncogenic processes have been described, description of the role of miRNAs for preoperative chemoradiotherapy (CRT) in rectal cancer is lacking. Our purpose of this study was to define the expression pattern of miRNAs for prediction of response to chemoradiotherapy in rectal cancer. Rectal cancer patients (n=22) who underwent preoperative CRT (40Gy radiotherapy combined with S-1) were studied. S-1 is a novel oral fluoropyrimidine inhibitory for dihydropyrimidine dehydrogenase and has potent radiosensitizing property. RNA harvested from biopsy specimens of rectal cancer before preoperative CRT was hybridized to miRNA microarrays (821 genes). Response to CRT was determined by histopathologic examination (Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum) of surgically resected specimens and RECIST. Groups were classified as responders (grade 2 or 3, CR or PR) or nonresponders (grade 0 or 1, SD or PD), respectively. Response to CRT determined by histopathologic examination of surgically resected specimens and RECIST were as follows : responders (grade 2 or 3, n=15), (PR, n=14), nonresponders (grade 0 or 1, n=7), (SD, n=8). Response rate was 68% (grade 2 or 3) and 63% (PR). Two miRNAs (miR-142, 223) with increased expression were identified that correctly differentiated responders from nonresponders of CRT by histopathologic examination. One overexpressed (miR-223) and 4 underexpressed miRNAs (miR-17, 20, 92, 106) differentiated responders from nonresponders of CRT by RECIST. Rectal cancer may have a distinct miRNA expression to predict pathological response to preoperative chemoradiotherapy.

Key words : micro RNA, rectal cancer, chemoradiotherapy, S-1, pathological response